Original researches

The protein ratio at different poles of the enterocytes' cell membrane of the jejunum during the fetal stage in cattle

D. M. Masiuk

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Received: 31 January 2020

Revised: 13 March 2020

Accepted: 20 March 2020

Dnipro State Agrarian and Economic University, Sergii Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine

Tel.: +38-050-636-62-37

E-mail: dimasiuk@gmail.com

Cite this article: Masiuk, D. M. (2020). The protein ratio at different poles of the enterocytes' cell membrane of the jejunum during the fetal stage in cattle. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 8(1), 62–68. doi: 10.32819/2020.81010

Abstract. Polarity plays a decisive role in ensuring the functional properties of intestinal enterocytes, the apical membrane is responsible for the hydrolysis and transport of substances, while basolateral membrane is responsible for the entry of substances into the bloodstream. For the research were used 80 two to nine months old cattle fetuses. To obtain apical and basolateral membranes from a suspension of isolated enterocytes from the cattle's jejunum, the basic method of differential centrifugation in the author's modification was used. New data on the concentration dynamics of individual protein fractions on the enterocytes apical and basolateral membranes from the jejunum of cattle fetuses are presented. It is established that during the late fetal stage there are dynamic changes in the polypeptide composition of the apical and basolateral membranes of enterocytes, which are characterized not only by changes in their ratio but also by redistribution between the poles of these cells. In the apical and basolateral membranes, respectively, 31 and 27 protein fractions were detected with molecular weights from 9.6 kDa to 300 kDa. At this moment, there is a decrease in the content of low molecular weight protein fractions and an increase in the proportion of high molecular weight ones. The expression and content of different polypeptide fractions on the polar domains of the jejunal enterocytes of 9-month-old cattle fetuses are characterized by a predominance of low molecular weight proteins (from 21 kDa to 33 kDa) in the apical membrane, while in the basolateral – proteins of higher molecular weight are dominant (from 35 kDa to 300 kDa). Thus, the apical membrane has a higher content of proteins with a molecular weight of 17 kDa – 8.48 times more than in basolateral ($P \leq 0.001$), 21 kDa – 1.23 times more ($P \leq 0.001$), 22.5 kDa – 6.39 times ($P \leq 0.001$), 24 kDa – 1.29 times ($P \leq 0.001$), 26 kDa – 1.56 times ($P \leq 0.001$), 29 kDa – 1.27 times ($P \leq 0.01$), 31 kDa – 1.54 times ($P \leq 0.001$), 33 kDa – 1.61 times ($P \leq 0.001$) and 46 kDa – 1.56 times ($P \leq 0.01$). In contrast, in the enterocytes basolateral membrane there is a higher content of polypeptide fractions compared to that in the apical membrane, with a molecular weight of 15.5 kDa – 3.64 times more ($P \leq 0.001$), 35 kDa – 1.63 times ($P \leq 0.01$), 39 kDa – 1.88 times ($P \leq 0.001$), 43 kDa – 1.87 times ($P \leq 0.001$), 52 kDa – 1.26 times ($P \leq 0.001$), 63 kDa – 1.11 times ($P \leq 0.05$), 66 kDa – 1.29 times ($P \leq 0.001$), 87 kDa – 3.16 times ($P \leq 0.001$), 100 kDa – 3.03 times ($P \leq 0.001$), 155 kDa – 1.15 times ($P \leq 0.05$), 170–185 kDa – 1.50 times ($P \leq 0.001$) and 300 kDa – 1.59 times ($P \leq 0.001$).

Keywords: polypeptides; jejunum; enterocytes; apical membrane; basolateral membrane.

Співвідношення протеїнів на різних полюсах плазмолемі ентероцитів порожньої кишки у плодовий період розвитку великої рогатої худоби

Д. М. Масюк

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Анотація. Визначальне значення у забезпеченні функціональних властивостей ентероцитів кишечника відіграє їх полярність, апікальна мембрана відповідає за гідроліз і транспорт речовин, а базолатеральна – за надходження речовин у кровоносне русло. Для досліджень використано 80 плодів великої рогатої худоби, віком від двох до дев'яти місяців. Для отримання апікальних і базолатеральних мембран із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби застосовували базову методику диференціального центрифугування у авторській модифікації. Наведено нові дані щодо динаміки концентрації окремих білкових фракцій на апікальній і базолатеральній мембранах ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Встановлено, що у пізній плідний період відбуваються динамічні зміни поліпептидного складу апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів, що характеризуються не лише змінами їх співвідношення, а й перерозподілом між полюсами цих клітин. У апікальних і базолатеральних мембранах виявлено відповідно 31 і 27 білкових фракцій з молекулярною масою від 9,6 кДа до 300 кДа. У цей час відбувається зменшення вмісту низькомолекулярних білкових фракцій і збільшення частки високомолекулярних. Експресія та вміст різних поліпептидних фракцій на полярних доменах ентероцитів порожньої кишки 9-місячних плодів великої рогатої худоби характеризуються переважанням умісту білків із невисокою молекулярною масою (від 21 кДа до 33 кДа) в апікальній мембрані, тоді, як у базолатеральній – домінують значно важчі білки (від 35 кДа до 300 кДа). Так, у апікальній мембрані встановлено більший вміст білків з молекулярною масою 17 кДа – у 8,48 ($P \leq 0,001$), 21 кДа – у 1,23 ($P \leq 0,001$), 22,5 кДа – у 6,39 ($P \leq 0,001$), 24 кДа – у 1,29 ($P \leq 0,001$), 26 кДа – у 1,56 ($P \leq 0,001$), 29 кДа – у 1,27 ($P \leq 0,01$), 31 кДа – у 1,54 ($P \leq 0,001$), 33 кДа – у 1,61 ($P \leq 0,001$) та 46 кДа – у 1,56 разів ($P \leq 0,01$). На відміну

від цього у базолатеральній мембрані ентероцитів більший уміст поліпептидних фракцій з молекулярною масою 15,5 кДа – у 3,64 ($P \leq 0,001$), 35 кДа – у 1,63 ($P \leq 0,01$), 39 кДа – у 1,88 ($P \leq 0,001$), 43 кДа – у 1,87 ($P \leq 0,001$), 52 кДа – у 1,26 ($P \leq 0,001$), 63 кДа – у 1,11 ($P \leq 0,05$), 66 кДа – у 1,29 ($P \leq 0,001$), 87 кДа – у 3,16 ($P \leq 0,001$), 100 кДа – у 3,03 ($P \leq 0,001$), 155 кДа – у 1,15 ($P \leq 0,05$), 170–185 кДа – у 1,50 ($P \leq 0,001$) та 300 кДа – у 1,59 разів ($P \leq 0,001$) від такого у апікальній мембрані.

Ключові слова: поліпептиди; порожня кишка; ентероцити; апікальна мембрана; базолатеральна мембрана.

Вступ

На сьогодні досить добре досліджені структурно-функціональні особливості плазматичних мембран ентероцитів, встановлена їх участь у транспортних і регуляторних процесах (Grandl et al., 2017). Ключове значення у забезпеченні функціональних властивостей цих клітин відіграє їх полярність (Melnychuk et al., 2002), зокрема, апікальна мембрана відповідає за гідроліз і транспорт речовин, а базолатеральна – за їх надходження у кров (Tsvilikhovskyi et al., 2014). Основою функціональних відмінностей різних доменів мембран являються особливості їх поліпептидного і ліпідного складу (Rodriguez-Boulan & Powell, 1992). Визначальні структурно-функціональні компоненти мембран плазмолем ентероцитів – це поліпептиди, що забезпечують транспорт і секрецію поживних речовин, мембранний гідроліз, рецепцію та регуляцію клітинного метаболізму (Tarabova et al., 2016). Білковий склад плазмолем ентероцитів залежить від багатьох чинників (тип годівлі, вік, вид тварин, фізіологічний стан і ін.) однак дані щодо динаміки змін експресії поліпептидного складу мембран цих клітин у великої рогатої худоби протягом плодового періоду розвитку на сьогодні фрагментарні та нечисленні (St Johnston, & Sanson, 2011; Masiuk, 2019).

Переважають більшість мембранних протеїнів утворюють надмолекулярні ансамблі, хоча всередині мембранного бішару в них немає структурної необхідності, вони повністю занурені всередину власне клітинної мембрани і легко переміщуються у латеральному напрямку (Tarabova et al., 2016). Розподіл індивідуальних білків апікальної і базолатеральної мембран детально вивчений у різних видах епітелію. Встановлено ряд протеїнів, які були використані в якості маркерів для апікальних і для базолатеральних мембран. На апікальному домені ентероцитів виявлені і кількісно ідентифіковані наступні білки: лужна фосфатаза, дипептидилпептидаза, гаммаглутамілтрансфераза, лейцин амінопептидаза (амінопептидаза N), мальтаза, нейтральна ендонуклеаза, нуклеотидаза (Gajda & Storch, 2015). На базальному домені ентероцитів виявлені та ідентифіковані: аденілатциклаза, лужна фосфатаза, АТФ-залежні H-2 антигени (Gessner et al., 1998), Na⁺/K⁺-АТФаза (Almássy et al., 2019). Дослідниками встановлено відносно високий уміст експресії протеїнів із молекулярною масою 37, 40 та 43 кДа у мембранній фракції лізатів ентероцитів порожньої кишки щойно новонароджених телят із подальшим збільшенням у віці 24 години (Holopura et al., 2017). У зв'язку з наведеним, з наукової точки зору, важливо дослідити особливості експресії протеїнів плазмолем ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. Мета роботи – дослідити динаміку співвідношень концентрації окремих протеїнів на апікальній і базолатеральній мембрані ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженнях використано 80 плодів великої рогатої худоби (Голштинської породи), віком від двох до дев'яти місяців, отриманих від клінічно здорових корів, під час вимушеного забою. Вік плодів встановлювали за масою та довжиною тіла, а також розвитком похідних шкіри за А. П. Студенцовим (2000).

Лабораторні дослідження проводили у Науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету (м. Дніпро) та проблемній науковій лабораторії внутрішніх хвороб тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ).

Після евтаназії плодів, розтинали черевну порожнину, виймали порожню кишку. Відділивши брижу, визначали довжину та середину кишки, видаляли вміст, після чого відбирали частину (30% від загальної довжини з середньої ділянки органу), яку використовували для одержання ізольованих ентероцитів. У дослідках використовували ділянку кишки у ранній плодовий період (два, три та чотири місяці) середньої довжиною 0,8 м; у пізній плодовий період (п'ять, шість, сім, вісім та дев'ять місяців) 1,7 м, яку, вивертали слизовою оболонкою назовні або розрізали уздовж та ділили на невеликі сегменти по 1,5–3 см і ретельно промивали (4–5 разів) холодним (4–6 °C) середовищем такого складу: 120 мМ NaCl та 1 мМ HEPES, за допомогою сухого трісу доводили рН до 7,4. Метод розрізання кишки у плодів від дво- до чотиримісячного віку використовували замість вивертання у зв'язку з її малим діаметром.

За основу виділення кишкових клітин був хімічний (цитрат/ЕДТО) метод (Tomchuk et al., 1994) на основі якого розроблена авторська модифікація методу (Masiuk, 2004a) отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Якість отриманих епітеліальних клітин оцінювали за морфологічними і функціональними показниками. Виділені клітини розфасовували в поліпропіленові флакони, позначали і зберігали в рідкому азоті протягом 2–6 місяців для подальшого використання.

Для отримання апікальних і базолатеральних мембран із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби використовували базову методику диференціального центрифугування (Tsvilikhovskyi, 1989) у авторській модифікації (Masiuk, 2004b). Схема отримання мембранних фракцій включала наступні етапи:

1. Гомогенізація суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі MPW-302 при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об/хв протягом 90 с у середовищі за наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс–HCl буфер при 4–6 °C, рН 7,4. Вимірювали концентрацію білка в ентероцитах у середовищі гомогенізації;

2. Диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги MSE High Speed 25 (Велика Британія). З метою очищення гомогенату від супутніх частин клітини та її органел (ядер, мітохондрій) і грубих мембранних фракцій його центрифугували при 10 тис. г протягом 15 хв; далі проводили центрифугування супернатанту для виділення апікальних мембран при 24 тис. г, а для базальних мембран при 84 тис. г протягом 60 хв. кожну. Оцінку якості центрифугування проводили за активністю маркерних ензимів плазматичної мембрани ентероцитів і мірою очищення мембранних фракцій відносно гомогенату;

3. Осад очищених фракцій апікальних і базальних мембран ресуспендували у фізіологічному розчині (t 4–6 °C, рН 7,4), які одразу використовували для дослідження поліпептидного складу чи поміщали в поліпропіленові флакони і зберігали в рідкому азоті. Ступінь гомогенізації контролювали за допомогою мікроскопа Olympus CH-20 у мазках забарвлених за Рома-

новським-Гімза, при збільшенні у 1 000 разів. Критерієм якості гомогенізації були: наявність незруйнованих клітин (недостатня гомогенізація) чи відсутність вираженого осаду при центрифугуванні (10 тис. g) гомогенату (надмірна гомогенізація). Ефективність отримання фракцій плазмолемі здійснювали по виходу мембранного матеріалу за кількістю білка. Оцінювали міру очищення та забруднення мембранних препаратів за активністю їх маркерних ензимів.

Дослідження вмісту і складу структурних протеїнів плазмолемі ентероцитів проводили за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі товщиною 1 мм (Laemmli, 1970). У гелі для розділення білків формували градієнт акриламідів $T = 7-18\%$. Склад розділяючого гелю: $T = 7-18\%$ і $C = 0,8-2,5\%$; 0,375 М трис-НСІ буфер (рН 8,8); 0,1% ДСН; 0,025% тетраетилдіаміну (ТЕМЕД); 0,025% персульфату амонію (ПСА). У 18% гелю додавали гліцерин до кінцевої концентрації 5% для запобігання нерівномірного набрякання гелю при забарвленні і знебарвленні та надання йому еластичності. Склад концентруючого гелю: $T = 4,5\%$, $C = 6\%$; 125 мМ трис-НСІ буфер (рН 6,8); 0,1% ДСН; 0,025% ТЕМЕД; 0,025% ПСА. Білкові проби вносили у буфері (рН 6,8), що мав такий склад: 1 М трис-НСІ, 5% ДСН; 2% дитіотриетолу; 1% 2-меркаптоетанолу; 30% гліцерину; 0,001% бромфенолового синього. Загальна концентрація білка не перевищувала 100 мкг на один зразок. У якості електродного буферу використовували розчин, який містив 25 мМ трис-НСІ (рН 8,3); 0,192 М гліцину; 0,1 % ДСН. Розділення проводили при фіксованому струмі і часі. Для забарвлення поліпептидних зон гелі фіксували протягом 12–16 год. при кімнатній температурі у розчині 12,5%-ої трихлороцтової кислоти. Електрофореграми забарвлювали у 0,1%-ому розчині кумасі G-250, розчиненого у 50%-му етанолі та 15%-вій оцтової кислоти протягом 12–16 год. Знебарвлення проводили у тому ж розчині, який не містив барвника. Гелі, які застосовували для імунохімічного виявлення Fc-γ-рецепторів, після закінчення електрофорезу промивали у дистильованій воді для того, щоб вилучити надлишок ДСН (Vlizlo et al., 2012).

Експериментальні дослідження проведені із дотримання вимог Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. «Про захист

тварин від жорстокого поводження» та узгоджуються з основними принципами «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), декларації «Про гуманне ставлення до тварин» (Гельсінкі, 2000) і Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Цифрові дані опрацьовували статистично: визначали середньоарифметичну величину (M); її похибку (m). Ймовірність різниці середніх значень встановлювали за критерієм Стюдента. Зміни показників вважали достовірними при $P < 0,05$ (у тому числі $P < 0,01$ і $P < 0,001$).

Результати

Динаміка відношень концентрації окремих білкових фракцій на апікальній і базолатеральній мембранах ентероцитів протягом раннього дослідного періоду істотно змінюється, що вказує на інтенсивні механізми дозрівання та формування полярних клітин у відповідні стадії плодового періоду. На окремих полюсах ентероцитів уміст поліпептидів неоднаковий, так у двомісячних плодів у мембранах апікальної частини відсутні білки з молекулярною масою 19 кДа, 24 кДа та 66 кДа, тоді, як на базолатеральній мембрані відсутні білки з масою 22,5 кДа, 155 кДа, 170–185 кДа та 205 кДа. Хоча решта фракцій поліпептидів у різних полюсах клітин спільні, їх уміст істотно різниться (Рис. 1). Так, у апікальній мембрані ентероцитів достовірно більша кількість білків із низькою молекулярною масою 9,6–14,2 кДа (у 1,56 раза; $P \leq 0,001$), тоді, як у базолатеральній – достовірно більша концентрація білків із молекулярною масою 15,5 кДа (у 2,06 раза; $P \leq 0,001$) та 17 кДа (у 3,62 раза; $P \leq 0,001$).

Слід відмітити, що у базолатеральній мембрані ентероцитів, порівняно з апікальною, більша відносна концентрація білків із молекулярною масою 29 кДа (у 1,36 раза; $P \leq 0,001$), 33 кДа (у 1,13 раза; $P \leq 0,01$), 43 кДа (у 1,47 раза; $P \leq 0,001$), 57 кДа (у 1,35 раза; $P \leq 0,001$), 63 кДа (у 1,43 раза; $P \leq 0,001$), 72 кДа (у 1,10 раза; $P \leq 0,05$), 100 кДа (у 1,87 раза; $P \leq 0,001$) та

Рис. 1. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 2-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

Рис. 2. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 3-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

120 кДа (у 1,82 раза; $P \leq 0,001$). Тоді, як у апікальній мембрані ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби достовірно більше білків із молекулярною масою 35 кДа (у 1,69 раза; $P \leq 0,001$), 39 кДа (у 1,49 раза; $P \leq 0,001$), 46 кДа (у 1,31 раза; $P \leq 0,001$) та 52 кДа (у 5,13 раза; $P \leq 0,001$).

З 2- до 3-місячного віку плодів відбувається певна зміна розподілення білкових фракцій між різними полюсами і лише відсоток поліпептидів із молекулярною масою 87 кДа та 33 кДа достовірно не різняться між полюсами ентероцитів (Рис. 2). Так, на апікальній мембрані ентероцитів плодів до 3-місячного віку збільшується уміст білків із молекулярною масою 75 кДа, 39 кДа та 31 кДа, і стає більше, відповідно у 1,40 ($P \leq 0,001$), 1,85 ($P \leq 0,001$) та у 1,16 раза ($P \leq 0,001$) від такого у базолатеральній мембрані цих клітин. Відсоток білків із молекулярною масою 15,5 кДа, 100 кДа та 120 кДа хоч і збільшується в апікальній мембрані, проте залишається достовірно меншим від такого у базолатеральній мембрані, відповідно у 1,55 ($P \leq 0,001$), 1,21 ($P \leq 0,001$) та у 1,44 раза ($P \leq 0,001$).

Уміст поліпептидних фракцій на апікальній мембрані ентероцитів 3-місячних плодів із молекулярною масою 9,6–14,2 кДа, 35 кДа достовірно не змінюється і залишається більшим у 1,44 ($P \leq 0,001$) та у 1,52 раза ($P \leq 0,001$) відповідно до такого у базолатеральній мембрані. Цікаво відмітити, що вміст білкових фракцій із молекулярною масою 29 кДа та 72 кДа у 2-місячному віці переважав на базолатеральній мембрані, а уже до 3-місячного віку був більше відповідно у 1,15 ($P \leq 0,05$) та 1,10 раза ($P \leq 0,05$) у апікальній мембрані ентероцитів.

У базолатеральній мембрані ентероцитів уміст поліпептидних фракцій з молекулярною масою 17 кДа, 43 кДа, 57 кДа та 63 кДа з 2- до 3-місячного віку достовірно не змінюється, однак залишається вищим відповідно у 3,40 ($P \leq 0,001$), 1,57 ($P \leq 0,001$), 1,47 раза ($P \leq 0,001$) та у 1,30 раза ($P \leq 0,001$) стосовно до цих показників апікальної мембрани клітин.

Уміст білкових фракцій з молекулярною масою 21 кДа та 26 кДа на різних полюсах ентероцитів у 2-місячних плодів достовірно не відрізнявся, у 3-місячному віці став достовірно у 1,32–1,34 раза ($P \leq 0,001$) більшим на базолатеральній мембрані клітин.

У 4-місячних плодів у базолатеральній мембрані ентероцитів з'являються білки з молекулярною масою 22,5 кДа та 155 кДа, однак їх уміст більше у 1,22 ($P \leq 0,001$) та 8,07 раза ($P \leq 0,001$) в апікальній мембрані клітин (Рис. 3).

З 4- до 5-місячного віку плодів відбувається подальше розподілення поліпептидних фракцій між різними полюсами клітин і лише співвідношення поліпептидів з молекулярною масою 15,5 кДа, 31 кДа, 43 кДа, 46 кДа та 57 кДа достовірно не відрізняється на різних мембранах ентероцитів (Рис. 4).

З 5- до 6-місячного віку плодів великої рогатої худоби відбувається незначний перерозподіл окремих фракцій поліпептидів між апікальною та базальною мембраною. Так, відбувається зрушення співвідношення білків з молекулярною масою 31 кДа у бік їх переважання в апікальній мембрані (більше у 1,60 раза; $P \leq 0,01$), поряд із зсувом полярної рівноваги білків із молекулярною масою 15,5 кДа, 43 кДа, 46 кДа, 72 кДа, 87 кДа та 100 кДа у бік їх переважання у базолатеральній мембрані (Рис. 5).

У базолатеральній мембрані ентероцитів порожньої кишки 6-місячних плодів уміст поліпептидів із молекулярною масою 15,5 кДа більше у 1,20 ($P \leq 0,01$), 43 кДа – у 1,12 ($P \leq 0,05$), 46 кДа – у 1,33 ($P \leq 0,001$), 72 кДа – у 1,29 ($P \leq 0,001$), 87 кДа – у 1,64 ($P \leq 0,001$) та 100 кДа – у 1,28 раза ($P \leq 0,001$).

Порівняно з базолатеральною, в апікальній мембрані ентероцитів плодів 6-місячного віку більший уміст білків із молекулярною масою 17 кДа у 2,08 ($P \leq 0,001$), 29 кДа – у 1,41 ($P \leq 0,01$), 31 кДа – у 1,60 ($P \leq 0,001$) та 52 кДа – у 1,51 раза ($P \leq 0,001$). І навпаки, у базолатеральній мембрані ентероцитів більший уміст поліпептидних фракцій із молекулярною масою 15,5 кДа, 43 кДа, 46 кДа, 63 кДа, 72 кДа, 87 кДа та 100 кДа від такого у апікальній мембрані, відповідно у 1,20 ($P \leq 0,01$), 1,12 ($P \leq 0,05$), 1,33 ($P \leq 0,001$), 1,16 ($P \leq 0,01$), 1,29 ($P \leq 0,01$), 1,64 ($P \leq 0,01$) та у 1,28 раза ($P \leq 0,001$).

У період із 6- до 7-місячного віку плодів великої рогатої худоби продовжує змінюватися співвідношення окремих фракцій поліпептидів між мембранами ентероцитів порожньої кишки (Рис. 6). Зокрема, якщо вміст білків із молекулярною масою 21 кДа, 26 кДа, 33 кДа та 120 кДа переважав у 6-місяч-

Рис. 3. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 4-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

Рис. 4. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 5-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

Рис. 5. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 7-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

Рис. 6. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 8-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

ному віці у базолатеральних мембранах (у 1,17–1,36 раза), то у 7-місячних ембріонів уміст цих поліпептидів більше в апікальній мембрані ентероцитів, відповідно у 4,38 ($P \leq 0,001$), 1,27 ($P \leq 0,001$), 1,22 ($P \leq 0,01$) та 1,30 раза ($P \leq 0,001$). З іншого боку білки з молекулярною масою 39 кДа та 155 кДа, яких було більше у апікальних мембранах ентероцитів 6-місячних плодів до 7-місячного віку домінують уже у базолатеральних мембранах клітин. Так, у базолатеральній мембрані ентероцитів 7-місячних плодів уміст поліпептидів із молекулярною масою 39 кДа

більше у 1,28 раза ($P \leq 0,01$), а 155 кДа – у 1,36 раза ($P \leq 0,001$), порівняно зі значеннями їх концентрацій в апікальній мембрані.

Слід зазначити, що незважаючи на те, що в апікальній мембрані ентероцитів порожньої кишки 7-місячних плодів з'являються поліпептидні фракції з молекулярною масою 66 кДа, їх все-таки у 1,58 раза ($P \leq 0,001$) менше, від таких у базолатеральній мембрані. Проте білки з молекулярною масою 300 кДа, що з'являються у 7-місячному віці в базолатеральній мембрані одразу домінують над їх умістом у апікальній мембрані (більше у 1,11 раза; $P \leq 0,05$). А поява білків із молекулярною масою 24 кДа в апікальній мембрані супроводжується їх переважанням на цьому домені у 1,87 раза ($P \leq 0,001$), порівняно з їх умістом у базолатеральній мембрані ентероцитів.

З 7- до 8-місячного віку плодів великої рогатої худоби співвідношення окремих фракцій поліпептидів між апікальною та базальною мембраною ентероцитів суттєво не змінюється (Рис. 7). Слід відмітити, лише переважання у базолатеральних мембранах ентероцитів порожньої кишки 8-місячних ембріонів умісту поліпептидів із молекулярною масою 170–185 кДа у (у 1,27 раза; $P \leq 0,001$), тоді, як білки з такою молекулярною масою у базолатеральних мембранах ентероцитів у 7-місячному віці були відсутні. Крім цього, білки з молекулярною масою 120 кДа змінюють до 8-місячного віку локалізацію з переважанням на базолатеральному домені (в 1,10 раза; $P \leq 0,05$), тоді як у попередньому етапі досліджень їх уміст був більше у апікальній мембрані ($P \leq 0,001$).

В апікальній мембрані ентероцитів плодів 8-місячного віку, порівняно з базолатеральною, залишається більший уміст білків із молекулярною масою 17 кДа – у 6,85 ($P \leq 0,001$), 21 кДа – у 1,33 ($P \leq 0,001$), 22,5 кДа – у 3,24 ($P \leq 0,001$), 24 кДа – у 1,54 ($P \leq 0,01$), 26 кДа – у 1,32 ($P \leq 0,001$), 29 кДа – у 1,73 ($P \leq 0,01$), 31 кДа – у 2,50 ($P \leq 0,001$), 33 кДа – у 1,56 ($P \leq 0,001$) та 52 кДа – у 1,19 раза ($P \leq 0,01$). Тоді, як у базолатеральній мембрані ентероцитів більший уміст поліпептидних фракцій із молекулярною масою 15,5 кДа (у 1,97; $P \leq 0,001$), 35 кДа у 1,75 ($P \leq 0,01$), 39 кДа (у 1,48; $P \leq 0,001$), 43 кДа у 1,70 ($P \leq 0,001$), 46 кДа (у 1,29; $P \leq 0,001$), 57 кДа у 1,33 ($P \leq 0,001$),

Рис. 7. Співвідношення вмісту структурних білків на різних полюсах мембран ентероцитів у 9-місячних плодів великої рогатої худоби, ум. од. ($M \pm m$, $n = 6$)

63 кДа ($y = 1,19$; $P \leq 0,01$), 66 кДа ($y = 1,33$ ($P \leq 0,001$), 72 кДа ($y = 1,17$; $P \leq 0,05$), 87 кДа ($y = 2,27$; $P \leq 0,001$) та 100 кДа ($y = 2,60$; $P \leq 0,001$), 120 кДа ($y = 1,10$ ($P \leq 0,05$), 155 кДа ($y = 1,24$ ($P \leq 0,001$), 170–185 кДа ($y = 1,27$ ($P \leq 0,001$) та 300 кДа ($y = 1,40$ раз ($P \leq 0,001$) від такого у апікальній мембрані.

Встановлено, що на кінцевому етапі досліджень із 8- до 9-місячного віку плодів великої рогатої худоби співвідношення поліпептидів із середньою молекулярною масою між апікальною і базальною мембранами суттєво не змінюється (Рис. 8). Проте, слід відмітити більшу концентрацію у базолатеральних мембранах ентероцитів порожньої кишки 9-місячних плодів умісту поліпептидів із молекулярною масою 52 кДа ($y = 1,26$ раз; $P \leq 0,001$). Причому, білки з молекулярною масою 46 кДа починають переважати на апікальному домені ($y = 1,56$ раз; $P \leq 0,001$). Білки з молекулярною масою 57 кДа, 72 кДа та 120 кДа в рівній мірі представлені на обох полюсах ентероцитів, тоді, як у 8-місячному віці вони домінували на базолатеральній мембрані.

Аналіз проведених досліджень вказує на те, що у апікальній мембрані ентероцитів плодів 9-місячного віку, порівняно з базолатеральною, переважає вміст білків із невеликою молекулярною масою (від 21 кДа до 33 кДа), тоді, як у базолатеральній мембрані домінують значно важчі білки (від 35 кДа до 300 кДа). Так, у апікальній мембрані встановлено більший вміст білків з молекулярною масою 17 кДа – $y = 8,48$ ($P \leq 0,001$), 21 кДа – $y = 1,23$ ($P \leq 0,001$), 22,5 кДа – $y = 6,39$ ($P \leq 0,001$), 24 кДа – $y = 1,29$ ($P \leq 0,001$), 26 кДа – $y = 1,56$ ($P \leq 0,001$), 29 кДа – $y = 1,27$ ($P \leq 0,01$), 31 кДа – $y = 1,54$ ($P \leq 0,001$), 33 кДа – $y = 1,61$ ($P \leq 0,001$) та 46 кДа – $y = 1,56$ раз ($P \leq 0,01$). На відміну від цього, у базолатеральній мембрані ентероцитів більший вміст поліпептидних фракцій із молекулярною масою 15,5 кДа – $y = 3,64$ ($P \leq 0,001$), 35 кДа – $y = 1,63$ ($P \leq 0,01$), 39 кДа – $y = 1,88$ ($P \leq 0,001$), 43 кДа – $y = 1,87$ ($P \leq 0,001$), 52 кДа – $y = 1,26$ ($P \leq 0,001$), 63 кДа – $y = 1,11$ ($P \leq 0,05$), 66 кДа – $y = 1,29$ ($P \leq 0,001$), 87 кДа – $y = 3,16$ ($P \leq 0,001$), 100 кДа – $y = 3,03$ ($P \leq 0,001$), 155 кДа – $y = 1,15$ ($P \leq 0,05$), 170–85 кДа – $y = 1,50$ ($P \leq 0,001$) та 300 кДа – $y = 1,59$ раз ($P \leq 0,001$) від такого у апікальній мембрані.

Обговорення

Результати досліджень вказують на стрімку динаміку змін якісних і кількісних відмінностей поліпептидного складу мембран ентероцитів великої рогатої худоби протягом усього плодового періоду (Nejsum & Nelson, 2007; Fölsch, 2008). Ці відмінності являються відображенням особливостей структури ентероцитів і вказують на різну функціональну роль різних доменів ентероцитів у фізіологічних процесах (травлення, всмоктування, секретотворення) (Tilney et al., 1973). Різність спектру поліпептидного складу ентероцитів плодів великої рогатої худоби пояснюють різним типом годівлі (Holopura et al., 2017). У ранній плодовий період відбуваються динамічні зміни поліпептидного складу апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів, що характеризуються не лише змінами їх співвідношення, але й перерозподілом між полюсами цих клітин. Так, у базолатеральній мембрані ентероцитів із 4-місячного віку плодів відбувається зменшення вмісту низькомолекулярних білкових фракцій та з'являються високомолекулярні поліпептиди з молекулярною масою 155 кДа. У пізньому плодовому періоді в плазмолемі ентероцитів порожньої кишки у апікальних і базолатеральних мембран виявлено відповідно 31 та 27 білкових фракцій молекулярної маси від 9,6 кДа до 300 кДа. Особливістю апікальної мембрані ентероцитів на цьому етапі являється наявність білків із молекулярною масою 80 кДа та 95 кДа, які у мембранах клітин плодів 4-місячного віку відсутні. Натомість у мембранах ентероцитів відбувається зменшення умісту низькомолекулярних білкових фракцій і збільшення поліпептидів з молекулярною масою більше за

100 кДа. З 7-місячного віку ембріонального розвитку з'являються фракції поліпептидів із молекулярною масою 24 кДа та 66 кДа.

Відмінність у експресії поліпептидів на окремих полюсах ентероцитів та її динамічні зміни протягом плідного періоду дають уявлення про структурні та функціональні зміни цих клітин (Abdullahi et al., 2018). У апікальній мембрані ентероцитів плодів 9-місячного віку переважає вміст білків із невисокою молекулярною масою (від 21 кДа до 33 кДа), тоді, як у базолатеральній – домінують значно важчі білки (від 35 кДа до 300 кДа).

Висновок

У ранній плодовий період відбуваються динамічні зміни поліпептидного складу апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби, що характеризуються не лише змінами їх співвідношення, але й перерозподілом між полюсами цих клітин. В апікальних мембранах ентероцитів з 3-місячного віку плодів з'являються високомолекулярні фракції поліпептидів із молекулярною масою 250 кДа та 300 кДа. В базолатеральній мембрані ентероцитів з 4-місячного віку відбувається зменшення вмісту низькомолекулярних білкових фракцій і з'являються високомолекулярні поліпептиди з молекулярною масою 155 кДа. У пізній плодовий період відбуваються істотні зміни білкового складу полюсів мембран ентероцитів, що характеризуються їх динамічним розподілом із переважанням у 9-місячному віці: у апікальній мембрані білків із невеликою молекулярною масою від 21 кДа до 33 кДа; у базолатеральній мембрані – білків з молекулярною масою від 35 кДа до 300 кДа. У апікальній мембрані встановлено більший ($P \leq 0,05$ – $0,001$) вміст білків із молекулярною масою 17 кДа, 21 кДа, 22,5 кДа, 24 кДа, 26 кДа, 29 кДа, 31 кДа, 33 кДа та 46 кДа, а у базолатеральній мембрані поліпептидів – 15,5 кДа, 35 кДа, 39 кДа, 43 кДа, 52 кДа, 63 кДа, 66 кДа, 87 кДа, 100 кДа, 155 кДа, 170–185 та 300 кДа.

References

- Abdullahi, W., Brzica, H., Hirsch, N. A., Reilly, B. G., & Ronaldson, P. T. (2018). Functional expression of organic anion transporting polypeptide 1a4 is regulated by transforming growth factor- β /activin receptor-like kinase 1 signaling at the blood-brain barrier. *Molecular Pharmacology*, 94(6), 1321–1333.
- Almássy, J., Diszházi, G., Skaliczki, M., Márton, I., Magyar, Z. É., Nánási, P. P., & Yule, D. I. (2019). Expression of BK channels and Na⁺-K⁺ pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear secretion. *The Ocular Surface*, 17(2), 272–277.
- Fölsch, H. (2008). Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 208–213.
- Gajda, A. M., & Storch, J. (2015). Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 93, 9–16.
- Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., & Schmidt, R. E. (1998). The IgG Fc receptor family. *Annals of Hematology*, 76(6), 231–248.
- Grandl, F., Schwarm, A., Ortmann, S., Furger, M., Kreuzer, M., & Claus, M. (2017). Kinetics of solutes and particles of different size in the digestive tract of cattle of 0.5–10 years of age, and relationships with methane production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(3), 639–651.
- Holopura, S. I., Maryniuk, M. O., & Tsvilikhovskiy, M. I. (2017). Експресія імунорецепторних протеїнів у плазмолемі ентероситів новонароджених телят у період формування колострального імунітету [Expression of immunoreceptor proteins

- in plasmolemma of enterocytes in formation of colostric immunity in newborn calves]. *The Animal Biology*, 19(2), 16–22 (in Ukrainian).
- Masiuk, D. M. (2004a). Methodological features of obtaining and structural characterization of isolated enterocytes of the small intestine epithelium of cattle. *Bulletin of the National Agrarian University*, 75, 148–152 (in Ukrainian).
- Masiuk, D. M. (2004b). Features of fractionation of plasma membranes isolated from small intestine enterocytes of cattle. *Bulletin of the National Agrarian University*, 78, 125–129 (in Ukrainian).
- Masiuk, D. M. (2019). Structural proteins of plasmolemma of the jejunum absorbing enterocytes of cattle fetus in early fetal period. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 2(3), 32–38.
- Melnichuk, D. O., Liubetska, T. V., Tsvilikhovskiy, M. I., Hryshchenko, V. A., & Yakymchuk, O. M. (2002). Postnatalni biokhimichni protsesy v orhanizmi novonarodzhenykh teliat [Postnatal biochemical process in the body of newborn calves]. *Ukrainian Biochemical Journal*, 74(4B/2), 98 (in Ukrainian).
- Nejsum, L. N., & Nelson, W. J. (2007). A molecular mechanism directly linking E-cadherin adhesion to initiation of epithelial cell surface polarity. *Journal of Cell Biology*, 178(2), 323–335.
- Rodriguez-Boulant, E., & Powell, S. K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annual Review of Cell Biology*, 8(1), 395–427.
- St Johnston, D., & Sanson, B. (2011). Epithelial polarity and morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(5), 540–546.
- Tarabova, L., Makova, Z., Piesova, E., Szaboova, R., & Faixova, Z. (2016). Intestinal mucus layer and mucins (A review). *Folia Veterinaria*, 60(1), 21–25.
- Tilney, L. G., Hatano, S., Ishikawa, H., & Mooseker, M. S. (1973). The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *The Journal of Cell Biology*, 59(1), 109–126.
- Tomchuk, V. A., Usatiuk, P. V., Tsvilikhovskiy, M. I., & Melnychuk, D. O. (1994). Otrymannia izolovanykh klityn epiteliu tonkoho kyshechnyka velykoi rohatoi khudoby [Obtaining isolated cells of the epithelium of the small intestine of cows]. *Physiological Journal*, 40(5/6), 45–51 (in Ukrainian).
- Tsvilikhovskiy, M. I., Bereza, V. I., Nemova, T. V., & Yakymchuk, O. M. (2014). Limitni faktory i patolohiia tvaryn antenatalnoho ta postnatalnoho rozvytku [Limiting factors and pathology of animals of antenatal and postnatal development]. *Bulletin of the Poltava State Agrarian Academy*, 3, 92–94 (in Ukrainian).
- Tsvilikhovskiy, N. I. (1989). Vydelenie apikal'noj i bazal'noj membran jenterocita tonkoj kishki korov i strukturno-funkcional'nye izmeneniya v nih pri patologii [Isolation of the apical and basement membranes of enterocyte of the small intestine of cows and structural and functional changes in them during pathology]. *Physiological Journal*, 35(5), 121 (in Russian).
- Vlizlo, V. V., Fedoruk, R. S., & Ratych, I. B. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biologii, tvarynnystvi ta veterynarii medytsyni [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine]. Lviv, Spolom (in Ukrainian).